

Ricardo Thomé Linhares

**Investigação Sobre os Peptídeos Transferidos para a Casca do Ovo
de *Callosobruchus maculatus* Alimentados com Vicilina de *Vigna
unguiculata* e seu Possível Efeito Antimicrobiano**

Trabalho submetido à disciplina
BIO7016- Trabalho de Conclusão
de Curso II da Universidade
Federal de Santa Catarina, requisito
parcial para a obtenção do Grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres
Silva

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Linhares, Ricardo Thomé

Investigação Sobre os Peptídeos Transferidos para a Casca
do Ovo de *Callosobruchus maculatus* Alimentados com
Vicilina de *Vigna unguiculata* e seu Possível Efeito
Antimicrobiano / Ricardo Thomé Linhares ; orientador,
Carlos Peres Silva - Florianópolis, SC, 2013.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Microscopia confocal. 3.
Presente nupcial. 4. Vicilina. 5. Poliândria. I. Silva,
Carlos Peres. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Ricardo Thomé Linhares

Investigação Sobre os Peptídeos Transferidos para a Casca do Ovo de *Callosobruchus maculatus* Alimentados com Vicilina de *Vigna unguiculata* e seu Possível Efeito Antimicrobiano

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção de Título de Bacharel em Ciências Biológicas, aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina

Florinópolis, 12 de julho de 2013.

Prof. Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Carlos Peres Silva, Dr.
Orientador

Prof.^a Evelise Maria Nazari, Dr.^a

Prof. Marcelo Farina, Dr.

Prof. Benedito Cortês Lopes, Dr.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Peres Silva, que desde 2008 tem me instruído na forma de conduzir experimentos, formular perguntas e analisar resultados. Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, Daniel Alexandre, Daniela Faria Florêncio, Daniele Kunz, Evelin Caroline de Azevedo e Gabriel Braga Oliveira que colaboraram com este projeto. As técnicas de microscopia do LCME da Universidade Federal de Santa Catarina, Eliana de Medeiros Oliveira e Renata Ozório que deram o apoio em todos os aspectos de microscopia do trabalho.

Aos colaboradores do projeto Prof.^a Adriana Ferreira Uchôa, Prof.^a Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, Prof. Cláudio Andrés Retamal, Prof. Diogo Ribeiro Demartini, Prof. José Roberto da Silva, Prof. José Xavierfilho, Prof.^a Maria Lígia Rodrigues Macedo, Prof. Renato Augusto DaMatta, Prof. Richard Ian Samuels, Sheila Marcia de Souza e Prof. Walter Ribeiro Terra.

Ao programa PIBIC do CNPq por fornecer a bolsa de iniciação científica que usufruí durante o período deste projeto.

A minha mãe Lourdes Terezinha Thomé que me deu todo o suporte para que pudesse me manter estudando e investindo na minha formação.

Resumo

Este trabalho mostra que a vicilina, uma proteína de reserva de sementes, presente na dieta dos besouros *Callosobruchus maculatus* após ser internalizada é processada pelos machos, sendo transferida para as fêmeas durante a cópula através do fluído seminal como presente nupcial. Larvas de terceiro estágio foram colocadas para se alimentar em sementes artificiais. As sementes foram montadas com farinha de *Vigna unguiculata* mais 0,5% vicilina marcada FITC ou RITC dentro de cápsulas de gelatina. Machos que haviam passado pelas dietas foram separados ainda virgens. Cópulas controladas de fêmeas virgens não marcadas, retiradas da colônia, com os machos com vicilina marcada foram realizadas. Em um primeiro momento cada fêmea copulou com um macho marcado, foi retirada e deixada ovipondo em um frasco coberto individual contendo sementes. No dia seguinte foi feita uma segunda cópula com um macho agora com outra marcação, as fêmeas foram deixadas ovipondo em frascos com sementes. Os ovos foram coletados após a segunda cópula e montados em lâminas escavadas para observação em microscópio confocal. As duas marcações foram observadas na superfície dos ovos mostrando a contribuição de ambos os machos nos peptídeos depositados sobre os ovos pelas fêmeas, confirmando que as fêmeas se utilizam dos peptídeos de vicilina recebidos como presente nupcial de mais de um macho. O cimento dos ovos foi coletado, as proteínas do cimento separadas por eletroforese e reconhecidas como sendo vicilina por Western blot. Obtendo uma banda abaixo do trímero de vicilina similar à vista em trabalhos anteriores, além de duas bandas das subunidades menores da vicilina reconhecidas pelos anticorpos anti-vicilina. Os resultados obtidos confirmam que o hábito poliândrico das fêmeas na espécie, possivelmente contribui para a defesa dos ovos através do aproveitamento de vicilina e peptídios antimicrobianos passados como presente nupcial seminal pelos machos.

Palavras-chave: Presente nupcial. Vicilina. Poliândria. Cópulas. Resistência antimicrobiana. Microscopia confocal.

Abstract

This work shows that the vicilin, a seed storage protein, present in the diet of the beetle *Callosobruchus maculatus* after being internalized is processed by males. It is transferred to the females during mating through the seminal fluid as a nuptial gift. Third instar larvae were put inside artificial seeds to feed. The artificial seeds were prepared with *Vigna unguiculata* flour FITC or RITC marked vicilin 0,5% inside gelatin caps. Males that passed through the diets were separated while still virgin. Controlled mating with non-marked virgin females, taken from the colony, with marked vicilin fed males were done. At a first moment each female mated with a marked male, they were put in a covered flask with seeds to lay eggs. The next day a second mating occurred, now with a male with different marking, females were left egg-laying in flasks with seeds. The eggs were collected after the second mating and laid over glass slides for confocal microscopy. The two markings were observed in the egg surface showing the contribution of both males in the peptides deposited over the eggs laid by the females, confirming that females use vicilin peptides received as a nuptial gift from more than one male. The eggs cement was collected, its proteins separated by electrophoresis and recognized as vicilin by Western blot. A band was obtained below the vicilin trimer similar to one seen in earlier works, as well as two bands of vicilin's smaller subunits recognized by the anti-vicilin antibody. The results obtained confirmed that the polyandric habit of females in this species, possibly contributes to egg defense through the usage of vicilin and antimicrobial peptides passed as a seminal nuptial gift by males.

Keywords: Nuptial gift. Vicilin. Polyandry. Mating. Antimicrobial resistance. Confocal microscopy.

Lista de Figuras

Fig. 1. Exemplo de frasco da colônia.....	21
Fig. 2. Semente artificial.....	22
Fig. 3. Modo de coleta do cimento.....	23
Fig. 4. Ovo de <i>C. maculatus</i>, Sobreposição dos planos focais do eixo Z.....	27
Fig. 5. Ovo de <i>C. maculatus</i>, Sobreposição dos planos focais do eixo Z, e sobreposição fluorescência e campo claro.....	28
Fig. 6. SDS PAGE 12% Cimento.....	29
Fig. 7. Western blot, cimento em diferentes quantidades.....	30

Sumário

Lista de Figuras.....	11
Sumário.....	13
Introdução.....	15
-1.1Objetivos.....	19
-1.1.1.Objetivo Geral.....	19
-1.1.2.Objetivos específicos.....	19
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	27
-3.1.Microscopia de luz.....	27
-3.2.Extração de proteínas.....	29
-3.3. Western blot.....	30
Discussão.....	31
Referências.....	35

Introdução

O grupo dos bruquíneos (Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae) é constituído por besouros que se alimentam de sementes principalmente de leguminosas (Fabaceae). A importância das diferentes culturas de feijões, ervilhas e soja só reforça a necessidade do estudo do grupo, uma vez que 80% das espécies de bruquíneos se alimentam exclusivamente de sementes de leguminosas, em muitos casos sendo os únicos animais a fazê-lo (Southgate, 1979).

A espécie *Callosobruchus maculatus* do bem sucedido género *Callosobruchus* de brocas de sementes do velho mundo, originalmente restrita ao continente africano e asiático está presente em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo pelo comércio de grãos (Southgate, 1979). A espécie ataca preferencialmente sementes secas maduras de feijões azuki (*Vigna angularis*), mungo (*Vigna radiata*) e, principalmente, o feijão de corda (*Vigna unguiculata*) tendo pouco ou nenhum sucesso em outras sementes de leguminosas (Janzen, 1977). Isso mostra a complexidade da interação inseto-planta, dado que as sementes de leguminosas estão entre os órgãos mais bem defendidos quimicamente (Alexandre et al., 2011) e são poucos os animais adaptados a se alimentar delas (Mota et al., 2003; Amorim et al., 2008).

Quanto ao seu ciclo de vida, as fêmeas ovipõem nas cascas das sementes armazenadas e cimentam os ovos com suas secreções. Os ovos são achatados na base e possuem uma entrada em uma das extremidades que leva a uma câmara de ar entre o ovo e o tegumento da semente, possivelmente para facilitar trocas gasosas com o embrião (Credland, 1992). Os embriões se desenvolvem até o primeiro estágio larval (primeiro instar) dentro dos ovos. As larvas eclodem e começam a se alimentar da semente abrindo um túnel onde ocorrerá o resto do seu desenvolvimento. As larvas passam do primeiro até o quarto estágio, chegando ao estágio de pupa e adulto, quando então os animais emergem das sementes pelas janelas pupais, as quais são produzidas pela erosão da face interna do tegumento pelas larvas de quarto estágio antes da pupação (Southgate, 1979). Sob condições de laboratório descritas em material e métodos o ciclo se completa em cerca de 28 dias, sendo 5 dias como embriões, 16 dias como larvas, 7 dias como pupa até emergirem como adultos. Os adultos não necessitam de alimento ou

água, sendo áfagos, toda a reserva necessária para a sua sustentação é obtida na fase larval. Os adultos podem copular múltiplas vezes ao longo da vida que pode durar entre 10 e quatorze 14 (Fox, 1993).

A fêmea de *C. maculatus* tem comportamento poliândrico, copulando com mais de um macho, que trabalhos da literatura como o de Fox (1993) explicam a poliandria como uma forma das fêmeas obterem nutrientes, resultando em um aumento na expectativa de vida das fêmeas e que esta vantagem foi menos perceptível quando uma fonte de nutrientes foi fornecida na forma de água com açúcar e leveduras. Sob condições onde são encontrados os animais, silos de grãos e depósitos, estas fontes não estão disponíveis para eles, logo o fato de não se alimentarem quando adultos continua válido para condições normais. Fox et al. (1995) ainda exploraram a contribuição dos machos para o presente nupcial considerando o custo elevado de cada ejaculação em média $>5\%$ da massa corporal dos machos, observando queda no volume da ejaculação de acordo com a idade e número de cópulas dos machos, sendo que machos virgens ejaculam uma quantidade maior e consequentemente passam uma contribuição maior para as fêmeas. Eady (1995) mostrou que não havia alteração na fecundidade da fêmea com a redução do volume do ejaculado e da quantidade de esperma, mas que volumes maiores resultavam em janelas maiores entre as cópulas das fêmeas. Estes intervalos maiores entre as cópulas garantem que os ovos postos durante o período foram fertilizados pelo mesmo macho.

Edvardsson (2007) concentrou-se na necessidade de água e relacionou tanto o volume do ejaculado do macho quanto à poliandria a reposição de líquidos da fêmea em ambientes com baixa disponibilidade de água, mas observou queda na longevidade das fêmeas que copularam várias vezes, o oposto do observado por Fox (1993). Edvardsson (2007) relaciona a queda em longevidade à mutilação provocada pelos machos a cada cópula (Crudgington e Siva-Jothy, 2000). Eady et al. (2007), ao reduzirem o volume do ejaculado utilizando machos que haviam copulado anteriormente mostraram quedas na longevidade e fecundidade também relacionadas à mutilação. Ursprung et al. (2009), ao disponibilizar água e nutrientes como em outros trabalhos (Fox, 1993; Edvardsson, 2007) chega à conclusão de que a água é o principal recurso que está sendo aproveitado do presente nupcial tendo relação direta entre a disponibilidade de água e a redução no número de cópulas

da fêmea. Este mesmo trabalho ainda mostra um aumento considerável na expectativa de vida das fêmeas que receberam água e água com açúcar, juntamente com uma maior produção de ovos e o sucesso da prole.

Hollander e Gwynne (2009) mostraram que fêmeas expostas continuamente a mais machos, consequentemente copulando mais vezes, tiveram uma longevidade e número da prole reduzidos. Neste caso como em Edvardsson (2007), aparentemente os benefícios do presente nupcial não foram capazes de compensar o prejuízo da mutilação. No trabalho de Tseng et al. (2007) além do aumento na longevidade de fêmeas que recebiam um volume maior de ejaculado e que copulavam mais vezes, também mostrou que a segunda cópula estimula a oviposição de mais ovos apesar de não alterar a velocidade de maturação dos ovócitos. Estes trabalhos mostram que de modo geral a poliandria traz benefícios para a fêmea tanto na longevidade quanto na fertilidade, mas as vantagens podem não estar restritas a isso.

As plantas possuem um variado arsenal de defesas físicas como tricomas, espinhos e outras estruturas que podem impedir a herbivoria, porém as principais defesas são químicas. Produtos do metabolismo secundário como fenóis, terpenos, glicosídeos cianogênicos e alcalóides entre os principais compostos, mas existem também registros de uma série de proteínas de defesa. Entre essas proteínas podemos citar as lectinas, arcelinas, inibidores de enzimas digestivas, quitinases e vicilinas (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Uchôa et al., 2006; Berenbaum e Zangerl, 2008). A vicilina presente nas sementes de *V. unguiculata* é uma proteína de reserva do tipo globulina 7S, uma cupina, euglobulina sendo solúvel em soluções salinas e se organizando em trímeros de cerca de 150 kD (Shutov et al., 1995). Estas proteínas chegam a compor de 70 a 80% das proteínas das sementes de feijão e possuem comprovada ação antimicrobiana e antifúngica na forma intacta (Chung et al., 1997; Gomes et al., 1997; Wang et al., 2001) ou de peptídeos derivados (Marcus et al., 1999; Ng, 2004; Manners, 2007; Marcus et al., 2008).

Macedo et al. (1993) mostraram que variantes destas proteínas geram resistência a *C. maculatus* através de mecanismos explicados por interação a glicoproteínas da membrana peritrófica e de superfície de microvilosidades. A resistência aos animais como *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Tenebrio molitor*, *Plodia interpunctella* e

Diatraea saccharalis tem sido explicada pela vicilina ser resistente a proteólise e se ligar a estruturas quitinosas do trato digestivo (Firmino et al., 1996; Mota et al., 2003; Amorim et al., 2008; Paes et al., 2008; Sales et al., 1996, 2001). Porém foi demonstrado por Uchôa et al. (2006) e Souza et al., (2010) que a vicilina ingerida pelas larvas de *C. maculatus*, se liga às membranas plasmáticas do epitélio intestinal e é transportada ainda na forma de trímero para o corpo gorduroso dos animais. No corpo gorduroso, a proteína é processada dentro de vesículas em peptídeos que possivelmente tem ação antimicrobiana (Souza et al., 2010). O processamento ocorre ao longo do desenvolvimento das larvas e diferencialmente entre machos e fêmeas. Souza et al. (2010) ainda mostraram que estes peptídeos ou até mesmo a proteína inteira passam para os ovos, diretamente provenientes das fêmeas ou vindos do fluido seminal dos machos como mostraram Alexandre et al. (2011), reforçando o fato que a absorção e processamento de vicilina ocorrem tanto em machos como em fêmeas.

O que buscamos neste trabalho foi mostrar que a passagem dos peptídeos derivados de vicilina através da ejaculação dos machos traz vantagens para a proteção dos ovos e que a poliandria na espécie aumenta a disponibilidade destes peptídeos para a fêmea poder investir na prole, o que acrescentaria a defesa da prole aos benefícios obtidos com o presente nupcial na espécie.

1.1- Objetivos

1.1.1- Objetivo geral

Demonstrar que a passagem do presente nupcial seminal e a poliandria na espécie *C. maculatus* são características que permitem a transferência de vicilinas e peptídeos que são gerados a partir de vicilinas para os ovos, reforçando sua defesa antimicrobiana.

1.1.2- Objetivos específicos

- Mostrar por microscopia confocal que vicilinas marcadas passam de machos diferentes para os ovos.
- Extração de proteínas do cimento buscando vicilinas e peptídeos.

Material e Métodos

2.1- Manutenção da colônia dos insetos

Os animais foram mantidos em frascos com sementes de *V. unguiculata* (Fig. 1), previamente desinfestadas por congelamento a -20°C . As colônias permaneceram em sala climatizada a uma temperatura de $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65 \pm 5\%$.

Fig.1. Exemplo de frasco da colônia: Frasco de vidro contendo sementes de *V. unguiculata* infestadas por *C. maculatus*.



Fonte: O autor

2.2- Preparação de amostras

Larvas de terceiro estágio retiradas de sementes da colônia foram transferidas para sementes artificiais, montadas com farinha de *V. unguiculata* com 0,5% de vicilina marcada colocada em cápsulas de

gelatina (**Fig. 2.**), e deixadas até emergirem como adultos. As cópulas foram realizadas com machos que passaram por dietas contendo vicilinas marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou isotiocianato de rodamina (RITC) e fêmeas controles virgens. Os primeiros cruzamentos foram feitos com um macho marcado e a fêmea controle. As fêmeas foram deixadas em frascos individuais contendo sementes de *V. unguiculata* para oviporem durante um dia. No dia seguinte, as mesmas fêmeas foram colocadas para copular com machos com marcação diferente do primeiro cruzamento e deixadas ovipositando pelos dias que sucederam a cópula, substituindo-se as sementes diariamente. Os ovos foram coletados no dia seguinte a cada oviposição com o auxílio de pinças e microscópio estereoscópico.

Fig. 2. Semente artificial: Semente artificial montada em cápsula de gelatina contendo farinha de *V. unguiculata*.



Fonte: O autor

2.3- Conjugação covalente de FITC e RITC com vicilina

Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e de rodamina (RITC) foram conjugados covalentemente com vicilina de *V. unguiculata*. FITC e RITC (50 mg em 1 ml de DMSO anidro) foram diluídos em tampão bicarbonato

0,75 M e pH 9,5 antes do uso. Adicionando FITC ou RITC em uma proporção de 1 mg por mg de vicilina, o tubo foi revestido com papel alumínio. A solução foi deixada incubando em temperatura ambiente com agitação por 1 h. A marcação que não se ligou à proteína foi removida por diálise em água destilada e a solução restante foi liofilizada.

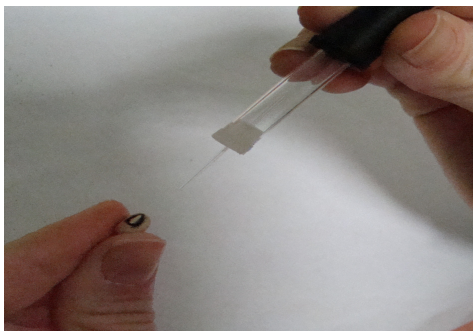
2.4- Microscopia confocal

Ovos coletados foram montados em lâminas de vidro côncavas e lamínulas e observados em microscópio confocal (Leica DMI6000 B Microscope) segundo Uchôa et al. (2006), Souza et al. (2010) e Alexandre et al. (2011).

2.5- Extração de peptídios a partir do cimento

Fêmeas de *C. maculatus* retiradas da colônia foram deixadas ovipondo em sementes de *V. unguiculata* dentro de frascos por 10 minutos. Com as sementes retiradas, a coleta dos peptídios foi iniciada com o auxílio de microscópio estereoscópico. Os ovos frescos (entre 10 e 30 minutos após oviposição) aderidos ao tegumento das sementes foram cobertos com solução de NaCl 250mM para dispersão do cimento e, em seguida, a suspensão foi recolhida com um capilar anexado a uma pêra para facilitar a coleta (**Fig. 3**).

Fig. 3. Modo de coleta do cimento: tubo capilar acoplado a uma pêra para coleta de cimento dos ovos.



Fonte: O autor

2.6- Determinação de proteínas

Determinações de proteína foram feitas com ácido biciconínico (BCA) de acordo com Smith et al. (1985), e modificado por Morton e Evans (1992), usando como padrão albumina sérica bovina.

2.7- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (Läemmli, 1970). Placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm foram utilizados. O gel de separação de acrilamida de 12% foi preparado misturando-se: 4,0 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 3,3 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, 0,1 mL de SDS 10%, 0,1 mL de persulfato de amônio 10% (APS), 0,005 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 10 mL. O gel de aplicação foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada, 0,5 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0,38 mL de tampão Tris/HCl 1,0 M pH 6,8, 0,03 mL de SDS 10%, 0,03 mL de persulfato de amônio 10% (APS), e 0,003 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 3 mL. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão Tris 25 mM, tricina 100 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8 contendo água destilada, glicerol 10%, SDS 10%, 2-β-mercapto-etanol e 1% de azul de bromofenol). A eletroforese correu a uma voltagem constante de 200 V durante aproximadamente 40 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue R. Foram utilizados como marcadores de massa molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β-lactoglobulina (18 kDa) e lisozima (14 kDa).

2.8- Western blotting

As proteínas foram eletrotransferidas dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose de acordo com a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente no tampão PBS (NaCl 136 mM, KCl 30 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 7H₂O 8 mM), contendo

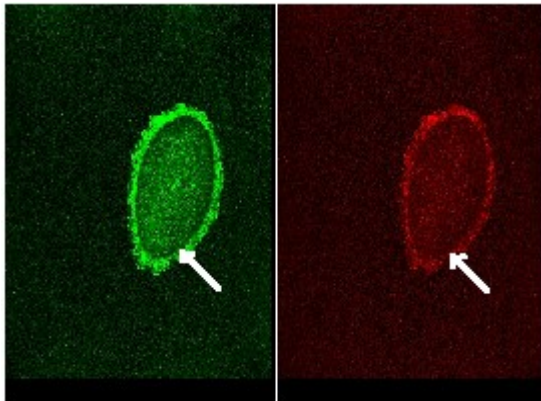
2% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-vicilina de *V. unguiculata* em tampão bloqueador por 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com PBS por 6 vezes (10 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (HRP) (1:2000), em tampão bloqueador, por 1 hora e 30 minutos. Passado o período de incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS por 6 vezes (10 minutos cada) e a revelação foi feita por DAB (diaminobenzidina): 0,1 mL de Tris/HCl 2 M pH 7,5, 5 mg de corante DAB, 0,3 mL de Imidazol, 4,9 mL de água destilada e 0,005 mL de H₂O₂. As membranas foram deixadas em contato com a solução reveladora por um período de 10 minutos ou até as bordas das membranas ficarem escurecidas. Para parar a reação, as membranas foram lavadas com água destilada.

Resultados

3.1- Microscopia confocal

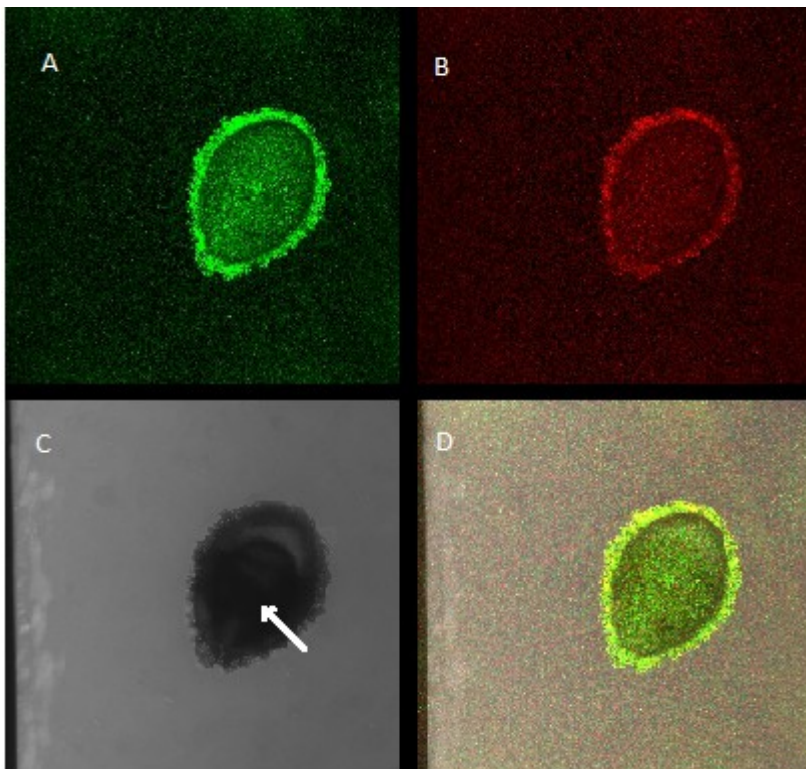
Ovos postos por fêmeas que haviam copulado com machos das duas dietas foram observados em microscópio confocal e apresentaram em verde a marcação FITC, em vermelho a marcação de RITC nos pontos onde vicilina ou peptídios derivados foram depositados (**Fig. 4**). É possível observar que a marcação em ambos os casos se espalha além do limite do córion e de uma forma irregular. As marcações estão distribuídas de forma diferente nas duas exposições.

Fig. 4. Ovo de *C. maculatus*, Sobreposição dos planos focais do eixo Z: Ovo coletado 2 dias após a fêmea controle copular com macho vicilina-RITC e 1 dia após copular com macho vicilina-FITC. A esquerda emissão verde (FITC) e a direita emissão vermelha (RITC). O córion apontado na imagem.



Na próxima imagem vemos as duas emissões de fluorescência (**Fig. 5. A, B**), a imagem em campo claro mostrando a morfologia do ovo com seta apontando o embrião em desenvolvimento (**Fig. 5. C**) e a sobreposição destas (**Fig. 5. D**) onde é possível ver pontos isolados de emissão verde e vermelha. Ainda na **Fig. 5. D** é possível ver pontos em amarelo onde houve a sobreposição das duas fluorescências.

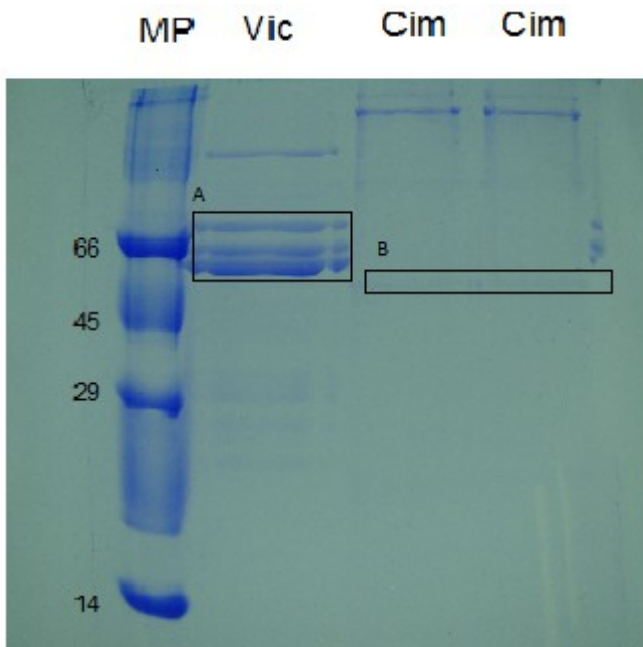
Fig. 5. Ovo de *C. maculatus*, Sobreposição de planos focais do eixo Z, e sobreposição fluorescência e campo claro: coletado 2 dias após a fêmea controle copular com macho vicilina-RITC e 1 dia após copular com macho vicilina-FITC. (A) emissão FITC, (B) emissão RITC, (C) campo claro, (D) sobreposição de A,B e C. Embrião no interior do ovo apontado na imagem C.



3.2- Extração de proteínas do cimento

Cimento coletado de ovos passou por eletroforese juntamente com marcador de peso molecular e vicilina (**Fig. 6**). A área (A) mostra o trímero de vicilina, enquanto na área (B) vemos nas duas aplicações de cimento uma banda logo abaixo do trímero similar a vista por Alexandre et al. (Fig. 6; 2011), possivelmente um peptídeo de vicilina.

Fig. 6. SDS PAGE 12% Cimento: (MP) marcador de peso molecular, numeração indica peso moléculas em kD. (Vic) Vicilina 0,05%, com o trímero mostrado pelo quadrado (A). (Cim) cimento de 300 ovos com uma banda circundada por (B).

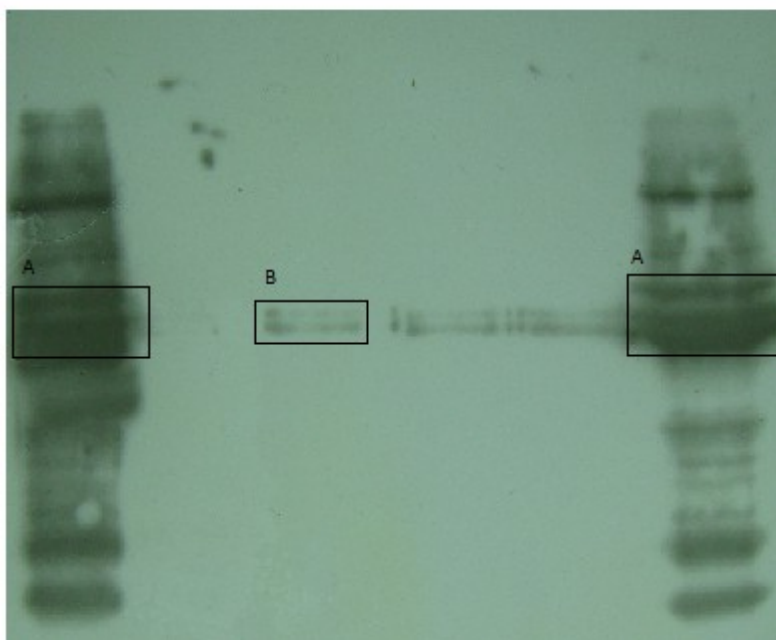


3.3- Western blot

Amostras de cimento passaram por SDS PAGE e foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a partir da qual foi realizado o Western blot (**Fig. 7.**). Na imagem temos evidenciado o trímero (A) e podemos ver nas raia de cimento (Cim) duas bandas correspondendo as subunidades menores da vicilina (B), sendo a melhor visualização na raia Cim(10).

Fig. 7. Western blot, cimento em diferentes quantidades: (Vic) vicilina 0,05% com o trímero evidenciado(A). (Cim) cimento de 300 ovos, raia onde foram aplicados 5, 10, 15 e 20 μ L de amostra, com duas bandas evidenciadas (B) na raia Cim(10) correspondendo as duas subunidades menores da vicilina.

Vic Cim(5) Cim(10) Cim(15) Cim(20) Vic



Discussão

Os resultados dos experimentos de cópulas (**Fig. 4 e 5**) mostraram a passagem de vicilina e peptídeos derivados oriundos dos machos para os ovos postos pela fêmea. Estas proteínas vindas da dieta passaram pelo epitélio intestinal, corpo gorduroso, hemolinfa e glândulas acessórias sendo transferidas durante a cópula pelo fluído seminal (Souza et al., 2010; Alexandre et al., 2011). A distribuição da fluorescência sobre o ovo, ultrapassando o limite do ovo propriamente (apontado na **Fig. 4**), nos levou a procurar as vicilinas e derivados no cimento que recobre os ovos.

O cimento, uma secreção da fêmea de *C. maculatus*, possui a função principal de fixar os ovos no tegumento das sementes que servirão de hospedeiras para as larvas (Southgate, 1979; Credland, 1992). A coleta do cimento e separação por eletroforese (**Fig. 6**) revelou uma banda um pouco menor que o trímero de vicilina, possivelmente a mesma extraída de ovos inteiros por Alexandre et al. (2011) e cujo sequenciamento mostrou correlação com sequências internas de vicilina. Até este ponto seguimos com o que havia sido proposto por trabalhos anteriores do grupo, de que a vicilina ingerida pelos animais era processada, transportada para glândulas acessórias do sistema reprodutor e acabava sendo depositada nos ovos (Alexandre et al., 2011). Ao realizar o Western blot das amostras de cimento (**Fig. 7**), as bandas correspondendo a duas subunidades menores da vicilina foram reconhecidas pelo anticorpo. Porém a banda do peptídeo visualizada no gel (**Fig. 6**) não foi reconhecida. A função de defesa antimicrobiana, proposta pelos trabalhos do grupo, presente no cimento pode resultar da ação das subunidades da proteína ainda inteiras (Chung et al., 1997; Gomes et al., 1997; Wang et al., 2001). O fato das subunidades terem passado para o cimento pode ser relacionado ao observado por Uchôa et al. (2006) e Souza et al. (2010), que detectaram o trímero em tecidos de animais da fase larval até a adulta. O sequestro de proteínas intactas não é inédito, sendo registrado por Sugimura et al. (2001) com a absorção de urease da amoreira pelas larvas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) entre outros exemplos (Jeffers e Roe, 2008).

As razões para a vicilina ser absorvida e estar presente ao longo da vida dos animais podem ser próprias para as necessidades de cada fase do desenvolvimento e variar de acordo com ponto do trajeto da proteína nos

animais. Começando pela fase larval, devemos nos lembrar que sob condições normais este será o único estágio em que os animais vão se alimentar, o momento que os besouros terão maior disponibilidade de vicilina. A presença da proteína nas larvas está claramente ligada a dieta e as funções desta na fase adulta, mas pode não estar limitada a elas.

A função antimicrobiana pode já estar ativa na fase larval como forma de proteção contra patógenos que venham a atacar o animal. Uma outra possibilidade que foi explorada Souza et al. (2010) é a de auxílio na manutenção do equilíbrio osmótico no organismo das larvas. As condições restritivas de umidade no interior das sementes estocadas gera uma grande pressão sobre os indivíduos, um estresse que parece ser equilibrado com o acúmulo de vicilinas na hemolinfa e corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus*. Condições de baixa umidade foram simuladas por Souza et al. (2010) reduzindo a umidade relativa das sementes de 15% para 5%, as larvas que infestaram as sementes mais secas haviam concentrado a proteína em seus corpos. Relações semelhantes entre a presença de vicilinas e condições de dessecação ou hidratação foram vistas em fungos e esporos de samambaia (Bäumlein et al., 1995; Shutov et al., 1998).

Nas fêmeas adultas de *C. maculatus* as vicilinas e peptídeos derivados passam para os ovos como forma de defesa química antes do embrião desenvolver hemócitos, células de defesa. Esta função é corroborada pelo registro de diminuição dos níveis de vicilina no organismo das fêmeas após a emergência, quando estariam ovipondo, juntamente a confirmação da passagem de vicilina para o cimento (Souza et al., 2010). O mesmo fenômeno de diminuição de vicilina no organismo durante a fase adulta ocorre nos machos da espécie (Souza et al., 2010) o que pode ser explicado pela passagem de presente nupcial (Alexandre et al., 2011). Ainda relacionado ao presente nupcial este trabalho apresentou a contribuição de mais de um macho nas vicilinas que protegem os ovos (**Fig. 4 e 5**), cobrindo a demanda das fêmeas de peptídeos, à medida que as reservas delas vão se esgotando.

Mesmo no ovo uma vez formado e o embrião desenvolvido em larva de primeiro estágio, antes de perfurar a semente, pode estar havendo passagem de vicilina intergeracional. Fazendo o acompanhamento de um ovo ao longo do seu desenvolvimento (**Fig. 4** e material suplementar, Alexandre et al. 2011) foi possível registrar a larva antes de eclodir

abrindo caminho pela casca do ovo, o que normalmente daria acesso ao tegumento da semente, consumindo os peptídeos depositados na superfície. O registro também mostra que as proteínas marcadas estão passando pelo trato digestório do animal, uma vez que há um acúmulo de excretas fluorescentes na região posterior do ovo.

A relação negativa entre a longevidade das fêmeas e o número de cópulas efetuado (Edvardsson, 2007; Eady et al., 2007; Hollander e Gwynne, 2009) é sempre relacionada ao estresse da mutilação (Crudgington e Siva-Jothy, 2000). A esta relação podemos também acrescentar a função antimicrobiana da vicilina, presentes na ejaculação, as proteínas antimicrobianas estariam protegendo a genitália feminina contra patógenos que pudessem invadir o organismo através dos ferimentos provocados pelo pênis do macho, uma possível adaptação que reduz os danos provocados à fêmea inpedindo infecções. Se tomarmos o experimento de Eady et al. (2007) como exemplo, podemos pensar que a redução no volume do ejaculado dos machos é proporcional a diminuição no presente nupcial de vicilinas, a redução na longevidade das fêmeas pode ter sido causada por infecções por patógenos. Os ferimentos em si podem ter um papel na rota de passagem de vicilinas, criando a conexão necessária entre a bursa copulatrix e a hemolinfa da fêmea que permite a incorporação do presente nupcial.

Muitas questões ainda devem ser exploradas na relação entre besouros *C. maculatus* e vicilinas como a interação com as membranas microvilares permitindo a internalização do trimer de vicilina, os receptores e rota de transcitose envolvidos. Existe ainda a formação de vesículas no corpo gorduroso e o mecanismo de proteólise relacionado a elas. O mecanismo específico de transporte pela hemolinfa, recebimento nas glândulas acessórias do sistema reprodutor, passagem do macho para a fêmea até chegar nos ovos precisa ser esclarecido. A confirmação da função antimicrobiana dos peptídeos no cimento e seu mecanismo de ação, experimentos que podem ser facilitados com a coleta de cimento em solução salina e uso desta para desafiar colônias de fungos e bactérias. Testes *in vivo* avaliando a taxa de sobrevivência, comparando ovos com diferentes quantidades de vicilina fornecida pelos parentais e ovos que tiveram a proteção removida pela coleta de cimento. Todos estes experimentos o grupo busca explorar ou já está trabalhando neles.

Referências

- Alexandre, D., Linhares, R. T., Queiroz, B., Fontoura, L., Uchôa, A. F., Samuels, R. I., Macedo, M. L. R., Bezerra, C. S., Oliveira, E. M., Demartini, D. R., Carlini, C. R., Silva, C. P. (2011). Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology* 57, 801-808.
- Amorim, T. M. L.; Macedo, L. L. P.; Uchoa, A. F.; Oliveira, A. S.; Pitanga, J. C. M.; Macedo, F. P.; Santos, E. A.; Sales, M. P. (2008). Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes during the Development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera:Piraliidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). *J. Agric. Food Chem* 56, 7738–7745.
- Bäumlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I. A., Shutov, A. D. (1995). Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *Journal of Molecular Evolution* 41, 1070–1075.
- Berenbaum, M. R., Zangerl, A. R. (2008). Facing the Future of Plant-Insect Interaction Research: Le Retour a` la “Raison d’Être”. *Plant Physiology* 146, 804-811.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–1539.
- Chung, R. P. T., Neumann, G. M., Polya, G. M. (1997). Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. *Plant Science* 127, 1–16.
- Credland, P. F. (1992). The Structure Of Bruchid Eggs May Explain the Ovicidal Effect Of Oils. *Journal of Stored Products and Research* 28, 1, 1-9.

- Crudgington, H. S., Siva-Jothy, M. T. (2000). Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407, 855–856.
- Eady, P. E. (1995). Why do male *Callosobruchus maculatus* beetles inseminate so many sperm? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36, 25–32.
- Eady, P. E., Hamilton, L., Lyons, R. E. (2007). Copulation, genital damage and early death in *Callosobruchus maculatus*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274, 247–252.
- Edvardsson, M. (2007). Female *Callosobruchus maculatus* mate when they are thirsty: resource-rich ejaculates as mating effort in a beetle. *Behavioral Ecology* 18, 183–188.
- Firmino, F., Fernandes, K. V. S., Sales, M. P., Gomes, V. M., Miranda, M. R. A., Domingues, S. J. S., Xavier-Filho, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 749–756.
- Fox, C. W. (1993). Multiple mating, lifetime fecundity and female mortality of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). *Functional Ecology*, 7, 203–208.
- Fox, C. W., Hickman, D. L., Raleigh, E. L. & Mousseau, T. A. (1995) Paternal investment in a seed beetle (Coleoptera:Bruchidae): Influence of male size, age, and mating history. *Annals of the Entomological Society of America* 88, 100–103.
- Gomes, V. M., Mosqueda, M. I., Blanco-Labra, Sales, A. M. P., Fernandes, K. V. S., Cordeiro, R. A., Xavier-Filho, J. (1997). Vicilin storage protein from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4110–4115.
- Hollander, M.; Gwynne, D. T. (2009). Female fitness consequences of

male harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculatus*. *Animal Behaviour* 78, 1061–1070.

-Jeffers, L. A., Roe, R. M. (2008). The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *Journal of Insect Physiology* 54, 319–332.

-Janzen, D. H. (1977). How Southern Cowpea Weevil Larvae (Bruchidae: *Callosobruchus Maculatus*) Die on Nonhost Seeds. *Ecology* 58, 4, 921-927.

-Läemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

-Macedo, M. L. R., Andrade, L. B. S., Moraes, R. A., Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 105C, 89–94.

-Manners, J. M. (2007). Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome Biology* 8:225.

-Marcus, J. P., Green, J. L., Goulter, K. C., Manners, J. M. (1999). A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia*. *The Plant Journal* 19, 699-710.

-Marcus, J. P.; Goulter, K. C.; Manners, J. M. (2008). Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity *in vitro*. *Plant Molecular Biology Reporter* 26, 75–87.

-Morton, R. E. and Evans, T. A. (1992). Modifications of the bicinchoninic acid proteins assay to eliminate lipid interference in determining protein content. *Analytical Biochem* 204, 332-334.

-Mota, A. C., DaMatta, R. A., Lima-Filho, M., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. (2003). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the

peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). Journal of Insect Physiology 49, 873-880.

-Ng, T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins. Peptides 25, 1215-1222.

-Paes, E. V., Uchôa, A. F., Pinto, M. S. T., Silva, C. P., Fernandes, K. V. S., Oliveira A. E. A., Xavier-Filho, J. (2008). Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. Entomologia Experimentalis et Applicata 129, 11-17.

-Shutov, A. D., Braun, H., Chesnokov, Y. V., Bäumlein, H. (1998). A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. European Journal of Biochemistry 252, 79–89.

-Shutov, A. D.; Kakhovskaya, I. A.; Braun, H.; Baumlein, H.; Muntz, K. (1995). Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: Evidence for a common single-domain ancestral gene. Journal of Molecular Evolution 41, n. 6, 1057-106.

-Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150, 76-85.

-Southgate, B. J., (1979). Biology of the Bruchidae. Annual Review of Entomology 24, 449–473.

-Souza, S. M., Uchôa, A. F., Silva, J. R., Samuels R. I., Oliveira, A. E. A, Oliveira, E. M., Linhares, R. T., Alexandre, D., Silva, C. P. (2010). The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae). Journal of Insect Physiology 56, 1130-1138.

-Sugimura, M., Hirayama, C., Nakamura, M., 2001. Selective transport of the mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph

of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 47, 1133–1138.

-Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, G. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, volume 76, 4330-4335.

-Tseng, H. F., Yang, R. L., Lin, C., Horng, S. B. (2007). The function of multiple mating in oviposition and egg maturation in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology* 32, 150–156.

-Uchôa, A .F., DaMatta, R. A., Retamal, C. A., Albuquerque-Cunha, J. M., Souza, S. M. de, Samuels ,R. I., Silva, C. P. and Xavier-Filho, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). *Journal of Insect Physiology* 52, 169-178.

-Ursprung, C., den Hollander, M. & Gwynne, D. T. (2009) Female seed beetles, *Callosobruchus maculatus*, remate for male-supplied water rather than ejaculate nutrition. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 781–788.

-Wang, X., Bunkers, G. J., Walters, M. R., Thoma, R. S., 2001. Purification and characterisation of three antifungal proteins from cheesewood (*Malva parviflora*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282, 1224–1228.